

VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM CAULES E RAÍZES DE ALGODOEIRO (*Gossypium hirsutum* L.) DE ACÔRDO COM A SUSCETIBILIDADE DE A *Fusarium oxysporum* f.vasinfectum (Atk.) SNYD e HANS ¹

Ednei de Conti²

E. Balmer³

J.D.P. Arzolla⁴

RESUMO

Os resultados do estudo da variação na composição dos aminoácidos em caules e raízes de plantas de algodoeiro resistentes e suscetíveis a *Fusarium oxysporum* f.vasinfectum, revelaram maiores diferenças nos caules, quando comparados com aqueles obtidos para raízes.

No estágio cotiledonar, tanto para plantas inoculadas como não inoculadas, os caules de plantas da variedade suscetível apresentaram maior teor de aminoácidos, quando comparados com aqueles de plantas resistentes.

Os caules das plantas suscetíveis em estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras, quando inoculadas, apresentaram maior teor de aminoácidos, quando comparadas com aqueles de plantas resistentes inoculadas com a mesma idade. Porém, para o caso de plantas não inoculadas, o teor de aminoácidos das plantas suscetíveis era ligeiramente inferior que o observado para as plantas resistentes.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho teve como finalidade a análise cromatográfica dos aminoácidos existentes em uma variedade e linhagem resistentes e uma variedade suscetível de *Gossypium hirsutum* L.

¹ Trabalho realizado com auxílio da USAID e da Fundação Rockefeller; entregue para publicação em 29 de novembro de 1967.

² Bolsista da USAID.

³ Cadeira de Fitopatologia da ESALQ.

⁴ Cadeira de Química Biológica da ESALQ.

A causa da resistência ou da suscetibilidade das plantas a certos patógenos é assunto que já despertou interesse em muitos pesquisadores.

Experimentos feitos com a finalidade de melhor serem entendidas as relações patógeno-hospedeiro, mostraram que em certos casos a maior ou menor quantidade de certos compostos fenólicos, influiu no processo de desenvolvimento da doença, enquanto que em outros casos os processos de doença eram afetados pela presença ou ausência de certos aminoácidos. Assim, KUC, WILLIAMS e SHAY (1957) observaram que folhas de variedades de macieira suscetíveis a *Venturia inaequalis* mostraram uma reação resistente após a injeção de fenilalanina no pecíolo. Por outro lado, STRIDER, citado por VAN ANDEL (1966), estudando a fisiologia do parasitismo relacionado com a sarna do pepino, causada por *Cladosporium cucumerinum* mostrou que o tratamento com ácido aspártico aumentou a intensidade da doença em pepinos infectados com o referido fungo.

Com relação à influência dos aminoácidos sobre o desenvolvimento dos fungos, WILSON (1958) observou que os ácidos aspártico e glutâmico inibiam a germinação de uredosporos de *Uromyces phaseoli*, enquanto que ALTEN e ORTH, citados por VAN ANDEL (1966), mostraram que a arginina inibia a germinação direta de esporângios de *Phytophthora infestans*.

Com relação ao desenvolvimento da doença e a composição de aminoácidos do hospedeiro, GASSNER e HASSELRANK, citados por VAN ANDEL (1966), constataram que a aplicação de asparagina ou glicina em folhas de trigo promovia a infecção das mesmas pela Ferrugem. Por outro lado, LAKSHMINARAYANAN (1955) mostrou que as variedades resistentes de algodão apresentavam maior quantidade de cistina quando comparadas a variedades suscetíveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Hospedeiro - Variedades usadas e obtenção das plantas

Utilizou-se no presente trabalho a variedade de algodoeiro IAC-RM4 e a linhagem IAC-Acala 3109 como resistentes a *Fusarium* e IAC-12 como suscetível.

Para cada variedade, em cada uma das duas semeaduras, foram semeados 2 vasos contendo solo autoclavado, recebendo cada vaso aproximadamente 30 sementes previamente deslintadas com ácido sulfúrico concentrado.

Quando as plantas da primeira sementeira apresentaram 3 folhas verdadeiras, foi feita uma segunda sementeira nos moldes da primeira com a finalidade de se obter plantas em diferentes estágios de desenvolvimento.

Uma semana após a segunda sementeira, as plantas resultantes do primeiro plantio apresentavam um número de folhas verdadeiras que variava entre 3 e 4 folhas. As plantas resultantes do segundo plantio na mesma ocasião apresentavam somente as folhas cotiledonares. As plantas foram mantidas em casa de vegetação procurando-se manter a temperatura numa faixa de 20°C a 26°C, e regadas com água de torneira.

O patógeno

O patógeno usado no presente experimento foi uma linhagem de *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* que, em experimentos anteriores, apresentou-se com alto grau de patogenicidade. O fungo foi multiplicado em 3 frascos erlenmeyer com capacidade para 250 ml os quais continham cada um 60 ml de meio de Armstrong e Armstrong (1958). As culturas foram mantidas em agitação por 7 dias após os quais as estruturas do fungo foram lavadas duas vezes com água destilada mediante centrifugação. A suspensão do fungo, em água destilada, usada como inóculo foi diluída para 1/5 da suspensão do fungo obtida após 7 dias em meio de cultura com agitação.

Inoculação

Dos dois vasos de cada variedade e linhagem semeados em épocas diferentes foram escolhidas de 20 a 24 plantas bem desenvolvidas. Estas foram retiradas cuidadosamente do substrato e inoculadas mediante a imersão do sistema radicular na suspensão diluída do fungo, sendo em seguida transplantadas para outros dois vasos contendo solo autoclavado. Como testemunhas foram usadas plantas das diferentes variedades e linhagem nos dois diferentes estágios de desenvolvimento, as quais não foram inoculadas, sendo no entanto, transplantadas para outros vasos contendo solo autoclavado. Para cada combinação de variedade e linhagem e estágio de desenvolvimento foram usados dois vasos e um número de aproximadamente 10 plantas por vaso.

Coleta de material e obtenção do extrato

Quinze dias após a inoculação, todas as plantas, independente da variedade e linhagem, que tinham sido inoculadas quando em estágio cotiledonar, apresentaram sintomas severos da

doença, isto é, murchamento dos cotilédones como também os caules e as raízes quando seccionados apresentavam escurecimento no xilema. As plantas que serviram como testemunhas apresentaram bom desenvolvimento não manifestando sintomas da doença. Por esta ocasião foi feita a coleta do material para as plantas em estágio cotiledonar, coletando-se separadamente as plantas das diferentes variedades e linhagem inoculadas e não inoculadas.

O material colhido foi lavado bem em água de torneira dividindo-se o mesmo em seguida em raízes e caules para cada variedade e linhagem inoculada ou não. Foi considerada raiz toda a porção abaixo do hipocótilo e caule a porção entre este e as folhas cotiledonares.

No mesmo dia em que foi feita a colheita procedeu-se a obtenção do extrato. Este foi obtido triturando-se 1,0 g do material, raízes e caules separadamente para cada variedade e linhagem inoculada ou não, em um gral de porcelana contendo uma pequena porção de areia quimicamente pura e álcool comum a 80% até que o mesmo se apresentasse completamente desintegrado. Após a decantação, o sobrenadante foi retirado por meio de uma pipeta sendo o volume do mesmo completado para 10 ml e guardado a temperatura de -15°C. Vinte dias após a inoculação as plantas que haviam sido inoculadas no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras apresentavam sintomas da doença. Estes eram muito mais drásticos nas plantas da variedade suscetível do que nas plantas da variedade e linhagem resistentes. As plantas da variedade e linhagem resistentes mostravam poucas folhas com sintomas, apresentando desenvolvimento normal apesar de inoculadas, enquanto que as plantas da variedade suscetível mostraram sintomas severos da doença chegando a afetar o desenvolvimento das plantas.

A colheita das plantas inoculadas quando estas se apresentavam com 3 e 4 folhas verdadeiras como também a obtenção do extrato foi feita de modo idêntico àquêle descrito para as plantas inoculadas em estágio cotiledonar.

Extração dos aminoácidos

O isolamento dos aminoácidos foi feito seguindo-se a técnica recomendada por ARZOLLA e FONSECA (1966), utilizando-se uma coluna de Dowex 50W-X8(100-200 "mesh") de 4 cm x 1,5 cm. Após a lavagem da coluna com 20 ml de água destilada, os aminoácidos foram deslocados pela passagem do NH_4OH 3N recebidos em vaso da Boemia, até a reação alcalina do eluído verificado pela

fenolftaleína. A solução contendo os aminoácidos foi evaporada em banho de areia, até secagem completa. O resíduo foi dissolvido posteriormente em 1 ml de álcool isopropílico a 10% e conservado em tubos hermêticamente fechados a uma temperatura de -15°C .

Técnica cromatográfica

A solução de aminoácidos em álcool isopropílico foi usada para a cromatografia monodimensional ascendente em papel de filtro Whatman nº 1, onde foram colocados separadamente 120 microlitros de cada extrato ocupando cada amostra uma área máxima de 5 mm de diâmetro.

Como solvente foi utilizada uma mistura de fenol e água nas proporções de 80:20 (p/v) e 0,040 g de 8 hidroxiquinoleína. Quando o solvente atingiu a altura de 30 cm, o papel foi retirado da cuba e sêco ao ar por um período de 12 horas.

A revelação foi feita pulverizando-se o papel com uma solução de ninhidrina a 1%, em etanol 95% e 0,01 g de 8 hidroxiquinoleína e aquecido em estufa a 75°C por 20 minutos. O cromatograma foi cortado em tiras de 4 cm de largura contendo respectivamente os aminoácidos de cada amostra e em seguida passadas em densitômetro. Desta forma foram obtidos os gráficos para os diferentes tratamentos, onde a intensidade da cor das manchas nos cromatogramas foi evidenciada pela altura dos picos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre as 2 variedades e a linhagem de algodoeiro em 2 idades diferentes inoculadas ou não, é apresentada nos gráficos I, II, III e IV.

Para uma melhor compreensão desses gráficos e uma melhor comparação entre os mesmos o eixo correspondendo a abcissa foi dividido em 4 faixas iguais. As faixas 1, 2, 3 e 4, cada uma com 15 unidades de extensão eram delimitadas respectivamente pelos pontos 5 a 20; 20 a 35; 35 a 50 e de 50 a 65.

Na faixa número 4 foi constatada a existência de um pigmento que apareceu para todos os tratamentos, variando no entanto em intensidade, razão pela qual não foi considerada esta faixa. Os resultados para as variedades e linhagem de algodoeiro em diferentes idades quando inoculadas ou não, foram os seguintes:

a) Caules de plantas em estágio cotiledonar não inoculadas com *Fusarium* - O gráfico I revelou que as plantas da variedade IAC-12 apresentaram uma maior quantidade de aminoácidos nas faixas 1, 2 e 3 quando comparadas as duas outras variedades. A linhagem IAC-Acala em nível bem inferior apresentou a menor quantidade de aminoácidos, ocupando a variedade IAC-RM4 uma posição intermediária.

b) Caules de plantas em estágio cotiledonar inoculados com *Fusarium* - O gráfico II mostrou que houve um aumento na quantidade de aminoácidos nas plantas das variedades IAC-12. A variedade e linhagem resistentes apresentaram as mesmas tendências entre si em virtude de um aumento na quantidade dos aminoácidos observado na linhagem IAC-ACALA.

c) Raízes de plantas em estágio cotiledonar não inoculadas - Não foi possível constatar diferença entre as variedades e linhagem pois, apresentavam de modo geral as mesmas tendências.

d) Raízes de plantas em estágio cotiledonar inoculadas - Foi notado que raízes de plantas da linhagem IAC-Acala, apresentando sintomas externos da doença, revelaram uma maior quantidade de aminoácidos na faixa 2, enquanto que as raízes de plantas da variedade IAC-RM4 revelaram um decréscimo na quantidade dos aminoácidos nesta mesma faixa. A variedade IAC-12 ocupou uma posição intermediária.

e) Caules de plantas no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras não inoculadas - O gráfico IV mostrou que embora as plantas da variedade e linhagem resistentes apresentassem uma mesma tendência, estas revelaram uma maior quantidade de aminoácidos que as plantas da variedade suscetível nas 3 faixas estudadas, mostrando por outro lado uma inversão dos dados obtidos para caules de plantas em estágio cotiledonar não inoculadas.

f) Caules de plantas no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras inoculadas - O gráfico III revelou que a variedade suscetível apresentou uma quantidade muito maior de aminoácidos em todas as faixas estudadas, quando comparada com a variedade e linhagem resistentes que apresentaram as mesmas tendências em um nível muito inferior.

g) Raízes de plantas no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras inoculadas e não inoculadas - Não foram notadas diferenças grandes na quantidade de aminoácidos entre as duas variedades e linhagem de algodoeiro quando inoculadas e não inocu

ladas, as quais de modo geral apresentaram as mesmas tendências.

Também foi feita uma análise cromatográfica dos caules de plantas com 3 a 4 folhas verdadeiras das diferentes variedades e linhagem inoculadas sendo que as plantas não mostraram os sintomas externos da doença. Os resultados mostraram as mesmas tendências que aquelas apresentadas nos caules no item f só que em grau menos acentuado.

No presente trabalho foi estudado o efeito da presença do fungo nas diferentes partes da planta de duas variedades e uma linhagem de algodoeiro em dois estágios de desenvolvimento.

Para muitos casos é sabido que a idade da planta ou órgão atacado influi na suscetibilidade a certos microrganismos. Os dados do presente trabalho mostraram que não houve diferenças grandes no teor de aminoácidos nas raízes de plantas no estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras tanto de variedade e linhagem resistentes como suscetível quando inoculadas com o fungo. Isto provavelmente seria uma explicação aos trabalhos de Armstrong, McLachlan e Weindling (1940) os quais mostraram que o número de plantas resistentes das quais foi isolado o fungo era maior que aquele representado por plantas resistentes mostrando sintomas. Isto sugere que o mecanismo de resistência está relacionado com a colonização do hospedeiro.

No caso de mecanismo de resistência estar relacionado com a capacidade ou não do fungo colonizar as plantas, a primeira parte a ser colonizada além da raiz, seria o caule. Examinando-se os resultados obtidos para os caules das diferentes variedades e linhagem quando inoculadas revelaram um fato interessante na quantidade de aminoácidos nas diferentes idades das plantas. A apreciação conjunta dos resultados para os caules das plantas das 2 variedades e a linhagem nos estágios cotiledonar e de 3 a 4 folhas verdadeiras quando não inoculadas mostraram que no primeiro estágio as plantas da variedade suscetível apresentaram um maior teor de aminoácidos quando comparados com as plantas da variedade e linhagem resistentes, enquanto que no segundo estágio as plantas da variedade suscetível apresentaram a menor quantidade de aminoácidos. Em se tratando de plantas inoculadas observou-se que quando foram comparadas os dois estágios de desenvolvimento, foi notado que em ambos os casos a variedade suscetível mostrou maior quantidade de aminoácidos que a variedade e linhagem resistentes. Foi notado também que em relação a variedade e linhagem resistentes, nas plantas mais jo

vens houve um aumento dos aminoácidos na faixa 2 enquanto que as quantidades de aminoácidos nas plantas mais idosas na mesma faixa foram mantidas num nível bem inferior. A maior suscetibilidade da variedade e linhagem resistentes no estágio cotiledonar e a maior resistência apresentada pelas mesmas num estágio mais avançado quando comparadas com os resultados obtidos pela cromatografia parece indicar um provável mecanismo de resistência relacionado com a capacidade de controlar o nível de aminoácidos no caule. Este mecanismo consistiria numa capacidade de controlar o teor de aminoácidos nas plantas resistentes quando inoculadas pelo fungo, enquanto que em plantas de variedades suscetíveis ou mesmo plantas resistentes em estágio cotiledonar o teor de aminoácidos aumentaria em virtude da não manifestação do mecanismo controlador ou gens de resistência.

Pesquisas futuras revelarão quais são os aminoácidos encontrados nas diferentes faixas o que muito contribuirá para a melhor compreensão da natureza da resistência.

RESUMO E CONCLUSÕES

a) Para o caso de plantas inoculadas o teor de aminoácidos em caules da variedade IAC-RM4, linhagem Acala 3109 e variedade IAC-12, quando em estágio de 3 a 4 folhas verdadeiras, mostrou-se alterado, quando comparado com o teor de aminoácidos em plantas não inoculadas.

b) O teor de aminoácidos em caules de plantas em estágio cotiledonar, tanto para plantas inoculadas ou não, foi sempre maior para a variedade suscetível.

c) Os caules das plantas da variedade e linhagem resistentes, quando inoculadas apresentaram as mesmas tendências em cada estágio de desenvolvimento, sendo que para o estágio de 3 a 4 folhas o nível de aminoácidos na faixa de 20 a 35 foi inferior àquêle observado para o estágio cotiledonar.

SUMMARY

The amino acids content of stems of cotton plants inoculated in the cotyledonary stage was greater for the susceptible variety IAC-12 than for the resistant variety and line respectively IAC-RM4 and Acala 3109. For the non inoculated plants of the same age the amino acids content of the stems of the susceptible variety was also greater than the one observed for the resistant plants.

The amino acids content of stems of cotton plants inoculated in the stage of three to four true leaves was much greater for the susceptible variety than for the resistant plants. However in the case of non inoculated plants of the same age the amino acids content of the susceptible variety was slightly lower than the one observed for resistant plants.

LITERATURA CITADA

- ARMSTRONG, G.M., J.D.MAC LACHLAN e R.WEINDLING, 1940 Variation in pathogenicity and cultural characteristics of the cotton wilt organism, *Fusarium vasinfectum*. *Phytopathology*, 30: 515-520.
- ARMSTRONG, J.K. e G.M.ARMSTRONG, 1958 A race of the cotton wilt *Fusarium* causing wilt of Yelredo Soybean and Flue - cured tobacco. *Plant Disease Reporter*, 42: 147-151.
- ARZOLLA, J.D.P. e H.FONSECA, 1966 Cromatografia de aminoácidos. *Boletim Didático da ESALQ*, nº 14. Mimeog.
- KUC, J., E.B.WILLIAMS e J.R.SHAY, 1957 Increase of resistance to apple scab following infection of host with phenylthiourea and D-phenylalanine. *Phytopathology* 47: 21-22.
- LAKSHMINARAYANAN, K., 1955 Role of cystine chelation in the mechanism of *Fusarium* wilt of cotton. *Experientia* 9, 388.
- VAN ANDEL, O.M., 1966 Aminoacids and Plant Diseases. In *Annual Review of Phytopathology*, vol. 4: 349-368.
- WILSON, E.M., 1958 Aspartic and glutamic acids as self-inhibitors of uredospore germination. *Phytopathology* 48, 595-600.









